

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.23.004

胆汁中外泌体及外泌体 RNA 提取方法比较^{*}

王有礼¹, 谭明娟¹, 葛贤秀^{2△}

1. 南京医科大学附属南京医院/南京市第一医院检验科, 江苏南京 210006;

2. 南京医科大学第二附属医院消化科, 江苏南京 210011

摘 要:目的 比较超速离心法和聚合沉淀法分离胆汁外泌体及外泌体 RNA 的差异。方法 收集 2017 年 6 月至 2018 年 12 月在南京医科大学第二附属医院消化内科行内镜逆行胆胰管造影术(ERCP)患者术中胆汁, 分别采用超速离心法和聚合沉淀法对胆汁进行分离。采用透射电镜法观察提取外泌体的形态; 采用粒径分析所得粒子的直径; 采用流式细胞术检测表面标记物 CD63 和 CD81 的表达差异; Trizol 法提取 RNA, 分析 RNA 水平及 A_{260}/A_{280} ; 采用实时荧光定量(RT-PCR)检测 4 种 miRNA 表达, 分析两种方法所得平均 CT 值的差异。结果 超速离心法和聚合沉淀法所得外泌体形态和粒径分布无明显差异; 流式细胞术分析显示, 超速离心法所得外泌体 CD63 和 CD81 阳性率较高。RNA 分析显示, 聚合沉淀法提取 RNA 水平较高, 检测的 miR-671-5p、miR-126-3p、miR-210-3p、miR-483-5p 平均 CT 值较小。结论 超速离心法和聚合沉淀法均可提取出一定数量的外泌体, 其中超速离心法得到的 RNA 较纯, 而聚合沉淀法得到的 RNA 水平较高, 可用于稀缺标本的检测。因此, 进一步寻找高敏感、高特异、经济便捷的方法仍然十分必要。

关键词:胆汁; 外泌体; 核糖核酸; 超速离心; 聚合沉淀

中图分类号: Q522

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)23-3405-05

Comparison of extraction methods for exosome and exosome RNA in bile^{*}

WANG Youli¹, TAN Mingjuan¹, GE Xianxiu^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Nanjing Hospital, Nanjing Medical University/First Hospital of Nanjing, Nanjing, Jiangsu 210006, China;

2. Department of Digestion, Second Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210011, China

Abstract: Objective To compare the differences in the isolation of bile exosome and exosome RNA between ultracentrifugation and polymerization precipitation. **Methods** The intraoperative bile during ERCP of the patients with choledocholithiasis was collected. The bile was separated by ultracentrifugation and polymerization precipitation respectively. The morphology of the exosome was observed by adopting the transmission electron microscopy; the diameter of the particles was determined by adopting the particle size analysis; the expression difference of surface markers CD63 and CD81 was detected by adopting the flow cytometry; RNA was extracted by the Trizol method, and the RNA concentration and A_{260}/A_{280} were analyzed. The expressions of four kinds of miRNA expressions were detected by RT-PCR, and the difference in mean CT values obtained by the two methods was analyzed. **Results** There was no significant difference in the morphology and particle size distribution of exosomes obtained by ultracentrifugation and polymerization precipitation. The flow cytometry analysis showed that the positive rates of exosomes CD63 and CD81 obtained by ultracentrifugation were higher. The RNA analysis showed that the concentration of RNA extracted by polymerization precipitation was higher, and the average CT values of miR-671-5p, miR-126-3p, miR-210-3p and miR-483-5p were smaller. **Conclusion** Both ultracentrifugation and polymerization precipitation can extract a certain amount of exosomes. RNA obtained by ultracentrifugation is purer, and the concentration of RNA obtained by polymerization precipitation is higher, and can be used in the detection of scarce samples. Therefore it is still necessary to find the ways with high sensitivity, high specificity, economy and convenience.

Key words: bile; exosome; RNA; ultracentrifugation; polymer precipitation

^{*} 基金项目: 南京市卫生科技发展专项资金项目(YKK18110, YKK18189)。

作者简介: 王有礼, 男, 主管技师, 主要从事临床生化和分子诊断研究。 △ 通信作者, E-mail: xianxiuge@njmu.edu.cn。

外泌体是细胞内多胞体与质膜融合后分泌到细胞外环境中的一种膜性囊泡。外泌体来源于晚期核内体,由活细胞分泌而来,几乎所有的细胞都能分泌,广泛存在于各种体液中。研究发现,外泌体可通过囊泡运输方式,在体内充当细胞间通讯使者角色^[1];在免疫应答、凋亡、血管生成、炎症及肿瘤发生、发展等过程中均有作用^[2-3]。目前,外泌体分离和纯化方法尚不统一,对临床转化造成一定困难。胆汁是胆管上皮细胞赖以生存的微环境,特别是其中所含外泌体中蕴含丰富的胆道疾病信息,是应用价值很高的液体活检标本。关于对人胆汁进行分离纯化的研究较少,大多采用超高速差速离心法^[4-5],但该方法具有操作耗时、所得标本量少等缺点。因此,寻找灵敏度高、简便快捷的提取方法至关重要。本文比较超速离心法和聚合沉淀法提取人胆汁外泌体和外泌体 RNA 的效果,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本收集 2017 年 6 月至 2018 年 12 月,收集南京医科大学第二附属医院消化内科因胆总管结石行内窥镜逆行胆囊-胰腺造影术(ERCP)的患者 15 例,标本为 ERCP 术中插管后造影前抽取得到的胆汁,每例患者胆汁收集量大于 10 mL。所有病例均经过影像学检查确认。所有患者术前均空腹,手术均由熟练的操作者实施,获取的胆汁提取后均立即储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。本研究得到南京医科大学第二附属医院伦理委员会批准,纳入研究的患者均于术前签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 超速离心机:Optima L-100 XP Ultracentrifuge(Beckman Coulter,美国),与之适配的 Beckman 超速离心管(50 mL,Beckman Coulter,美国);外泌体提取试剂:Total Exosome Isolation Reagent(from other body fluids)(Invitrogen,美国);0.22 μm 滤器(Merck Millipore,美国);透射电镜:Tecnai G2 Spirit Bio TWIN(FEI,美国);粒径检测仪器:ZETASIZER Nano series-Nano-ZS(Malvern,美国);流式细胞术:Accuri C6(BD Biosciences,美国);CD63 和 CD81 抗体(BD Biosciences,美国);RNA 提取试剂:Trizol(Invitrogen,美国);反转录试剂盒:Taqman MicroRNA Reverse Transcription KIT,引物 Taqman microRNA assays(applied biosystems,美国);实时荧光定量 PCR 试剂盒:Taqman Universal Master Mix II, no UNG(applied biosystems,美国)。

1.3 方法

1.3.1 外泌体分离 分别采用超高速差速离心法和外泌体提取试剂盒两种方法提取外泌体。

1.3.1.1 超高速差速离心法 标本解冻,取 4 mL 胆

汁加入等体积磷酸盐缓冲液(PBS)稀释, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $500\times g$ 离心 10 min;取上清液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $2\,000\times g$ 离心 20 min;再取上清液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $16\,500\times g$ 离心 20 min;用 0.22 μm 针头式过滤器过滤,超速离心机以 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $120\,000\times g$ 离心 70 min。弃去上清液,得到外泌体沉淀。用 200 μL PBS 重悬沉淀用于电镜、粒径及流式细胞检测,或直接加入 1 mL Trizol 用于 RNA 提取。获得的外泌体保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,进入后续实验流程。

1.3.1.2 聚合沉淀法 标本解冻,取 4 mL 胆汁,加入等体积 PBS 稀释, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $500\times g$ 离心 10 min;取上清液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $2\,000\times g$ 离心 20 min 去除残留细胞及碎片;再去上清液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $16\,500\times g$ 离心 20 min;用 0.22 μm 针头式过滤器过滤后至新管,冰上放置;加入 1/2 体积的 Total Exosome Isolation Reagent(for other body fluids),颠倒混合或移液器混合,直至完全混匀标本,室温下孵育 30 min,并 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $10\,000\times g$ 离心 30 min,移液器小心吸去上清液,获得的沉淀即为外泌体。

1.3.2 外泌体生物学特性鉴定

1.3.2.1 透射电镜法观察外泌体形态 在 100 μL PBS 中重悬细胞外囊泡。吸附 20 μL 至 400 目碳涂层的 Parlodion 铜网格 2 min,并在室温下干燥。通过将滴剂小心地放在干燥的制剂上,将外泌体在 1%戊二醛中室温下固定 5 min。洗涤网格 2 次,然后用 1%磷钨酸对比着色外泌体,持续 30 s。用电子显微镜获取图像,加速电压为 80 kV,放大倍数为 20 000 倍,在确定粒子大小时增加到 100 000 倍。

1.3.2.2 粒径分析外泌体直径分布 使用多参数纳米粒子光学分析的放大倍数以 200 kV 获取图像。将分离的外泌体重悬于 1 mL 无菌冷 PBS 中。慢慢倒入一次性清洁样品池,避免气泡,然后用盖子密封样品池。放入仪器 ZETASIZER Nano series-Nano-ZS 进行检测。使用动态光散射检测由于颗粒布朗运动而产生的散射光的波动,实现外泌体的可视化,并转换成粒子直径、扩散速率等信息。

1.3.2.3 流式细胞术检测外泌体表面标记物 用 200 μL 无菌冷 PBS 重悬分离的外泌体,然后与 20 μL CD63 和 CD81 抗体一起温育。没有标记为对照的抗体,上机检测显色的荧光强度。

1.3.3 外泌体 RNA 提取及实时荧光定量 PCR(RT-PCR)反应

1.3.3.1 RNA 提取 将所得外泌体沉淀加入 1 mL Trizol 进行裂解,冰上静置 5 min;加入 0.2 mL 的氯仿,快速上下剧烈颠倒混匀,放于冰上静置约 5 min,而后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min。轻轻吸取上层至新的离心管中,加入等体积的异丙醇,轻轻混匀,放于冰上静置 10 min,然后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15

min。弃上清液,在沉淀中加入 1 mL 预冷的 75% 乙醇,4 ℃、7 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,干燥后加入适量的 DEPC 水,轻轻吹打混匀。吸取 1 μL 的 RNA 溶液在 RNA 水平检测仪上,并计算总 RNA 水平及 A_{260}/A_{280} 。

1.3.3.2 反转录反应 配制反转录反应 MIX:Dntp mix 0.15 μL;Multiscribe RT enzyme 1 μL;10×RT buffer 2 μL;Rnase Inhibitor 0.19 μL;Nuclease-Free-Water 补足至 4.16 μL。以 15 μL 体系为例,取 7 μL 上述 RT master mix,3 μL Taqman microRNA assays(5×),5 μL RNA(1~10 ng),将上述体系混匀,离心。反转录的反应条件为 16 ℃ 30 min,42 ℃ 30 min,85 ℃ 5 min,4 ℃ 10 min。

1.3.3.3 RT-PCR 采用 10 μL 反应体系:Taqman Universal Master Mix II 5 μL;Taqman microRNA assays(20×)0.5 μL;cDNA+ddH₂O 4.5 μL。将上述体系混匀,4 ℃、1 000 r/min 离心 5 min,置入荧光定量 PCR 仪中进行扩增,反应条件:95 ℃ 10 min;95 ℃ 15 s 和 60 ℃ 60 s,循环 40 次。

1.3.4 外泌体 RNA 质量分析 采用 onedrop 紫外分光光度计检测 RNA 水平及 A_{260}/A_{280} , A_{280} 为蛋白质含量, A_{260}/A_{280} 为蛋白质污染比例,介于 1.8~2.1 为合格。

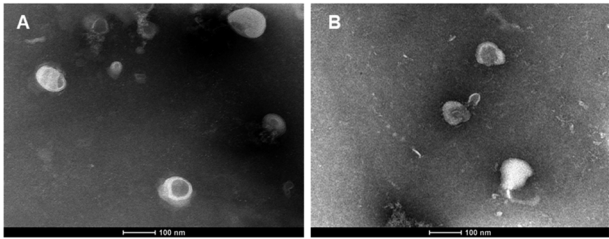
1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,非正态分布的计量资料用 Mann-Whitney 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同提取方法对外泌体生物学特性的影响 分别用透射电镜、粒径和流式细胞分析评估两种不同提取方法分离纯化外泌体的形态、直径和标志蛋白的分布情况。通过透射电子显微镜观察人胆汁中分离出的外泌体为直径在 30~150 nm 的带有双层膜的圆盘状结构,与之前报道的外泌体特征一致(图 1),两组间无明显差异。然后采用多参数纳米粒子跟踪分析(NTA),发现两种方法提取的人胆汁中的粒子直径均在 30~150 nm,平均直径分别为 72.2 nm 和 100.1 nm(图 2)。采用流式细胞术分析外泌体表面标记物 CD63 和 CD81 的表达,超速离心法得到外泌体 CD63 的阳性表达为 96.4%,CD81 的阳性表达为 91.9%;试剂法得到外泌体 CD63 的阳性表达为 69.8%,CD81 的阳性表达为 76.6%,表达量低于超速离心法(图 3)。

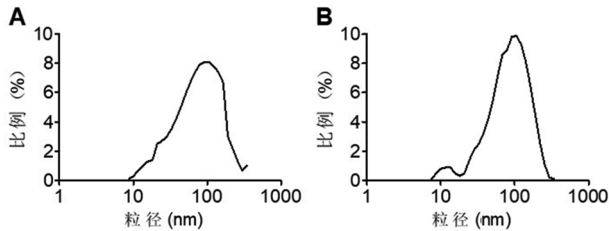
2.2 RNA 质量及其 miRNA 的表达 分别采用两种方法提取外泌体,Trizol 法提取 RNA,检测 RNA 水平和 A_{260}/A_{280} 情况。结果显示:超速离心法得到的 RNA 水平及 A_{260}/A_{280} 均较聚合沉淀法低。通过

RT-PCR 法得到 4 个 miRNA 的 CT 值,结果显示,超速离心法 CT 值大于聚合沉淀法,表明超速离心法所得 RNA 量小于聚合沉淀法(图 4)。图 4A 显示,聚合沉淀法能得到较高水平的 RNA,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);图 4B 显示,聚合沉淀法 A_{260}/A_{280} 较超速离心法高。图 4C 和表 1 显示,两种方法所得 miR-671-5p、miR-126-3p、miR-210-3p、miR-483-5p 平均 CT 值比较,超速离心法均大于聚合沉淀法($P < 0.05$)。



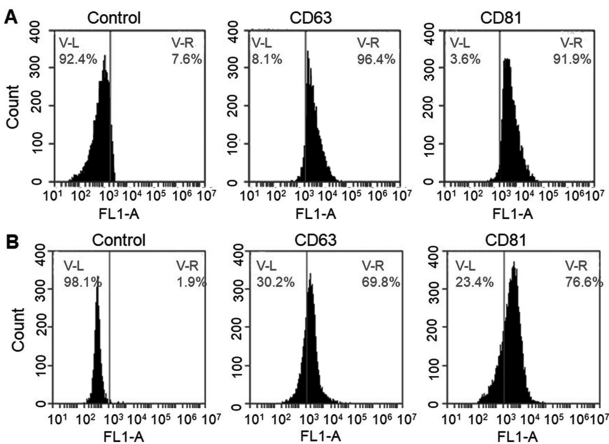
注:A 为超速离心组;B 为聚合沉淀组

图 1 人胆汁外泌体透射电镜图



注:A 为超速离心组;B 为试剂提取组;X 轴表示外泌体直径;Y 轴表示各直径所占比例

图 2 人胆汁中分离的外泌体粒径比较

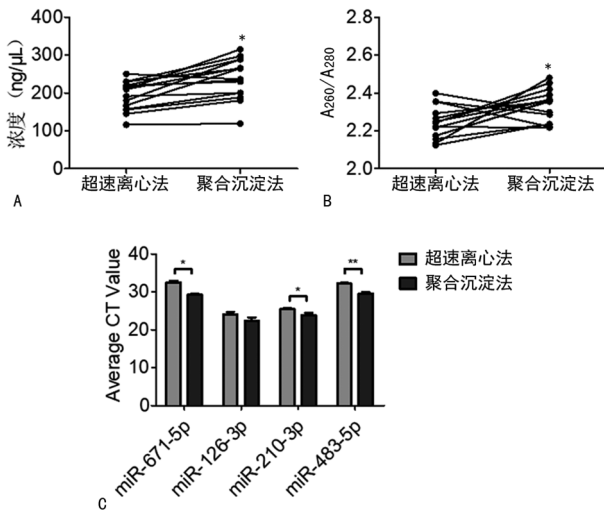


注:A 为超速离心法;B 为聚合沉淀法

图 3 流式细胞术分析外泌体表面特征蛋白 CD63 和 CD81

表 1 胆汁外泌体 miRNA 的表达在不同分离方法提取的比较

miRNA_ID	平均 CT 值($\bar{x} \pm s$)		<i>P</i>
	超速离心法	聚合沉淀法	
hsa-miR-671-5p	32.46±0.84	29.27±0.55	0.014
hsa-miR-126-3p	24.06±1.12	22.33±1.52	0.130
hsa-miR-210-3p	25.43±0.60	23.83±1.07	0.033
hsa-miR-483-5p	32.16±0.37	29.56±0.59	0.008



注:与超速离心法比较,* $P<0.05$; ** $P<0.01$

图 4 两种方法所得外泌体 RNA 质量比较

3 讨 论

外泌体是由细胞内体分泌而来,晚期内涵体膜向
内出芽形成,细胞内多泡体(MVB)与细胞膜融合后释
放到细胞外基质中的一种直径 30~150 nm 的膜性囊
泡。外泌体广泛存在于许多体液中,如血清、尿液、唾
液、腹水、羊水、乳汁等^[6]。外泌体作为大分子信息
物质的载体,含有丰富的蛋白质、脂质、DNA、mRNA、非
编码 RNA 等信号分子^[7]。因脂质双分子层的保护作
用,外泌体可在体液中稳定存在且半衰期长,其中的
标记蛋白及非编码 RNA 可选择性富集,提供丰富、稳
定、灵敏且特异的生物信息^[8-9]。外泌体具有稳定的
生物学特性、内容物富集多样及可实时检测等优点,
在疾病的早期诊断、复发监测、靶向药物治疗等领域
进展迅速、应用前景广阔^[10-12]。

胆汁是由肝细胞不断生成的具有苦味的有色液
汁,是胆管上皮细胞赖以生存的微环境,在脂肪代谢
中发挥重要的作用。有研究显示,胆汁外泌体中 5 种
miRNA 可作为胆管癌诊断组合,灵敏度和特异度分
别为 67%和 96%,优于血清 CA199 检测^[5]。笔者前
期的研究也显示,胆汁外泌体 lncRNAs 具有一定的
诊断灵敏度和特异度,且其水平升高与患者不良预后
呈正相关,可作为胆管癌重要的诊断和预后判断标记
物^[13]。除了外泌体中包含的内容物,单纯胆汁外泌体
浓度对区分胆道良恶性狭窄的准确度可达 100%^[14]。
总之,胆汁外泌体在疾病诊断中发挥重要作用,相对
于其他体液,有关胆汁外泌体的研究较少,外泌体中
所含遗传信息及其相关作用机制有待进一步深入。

因胆汁成分复杂,包括胆汁酸、胆盐、蛋白等,临
床获得的胆汁中多伴有感染、泥沙样结石等,对分离
和过滤造成一定的困难,获得的产量较低;另外,胆汁
的分泌受饮食等影响,个体差异也较大。目前分离外

泌体的方法主要有超速离心法、密度梯度离心法、超
滤法、磁珠免疫捕获和聚合沉淀法等^[15],目前尚没有
标准化的分离步骤^[16-17]。这些方法提取外泌体的纯
度及其效率是否一致有待进一步研究,这间接导致类
似研究获得的结果不一致或重复性不佳,很大程度上
影响功能研究的可重复性和临床应用的标准化。从
胆汁中分离外泌体较血浆和细胞上清液难度更大,报
道较多的是采用超速离心法。该方法有耗时长、成本
高、得率较低等缺点,从实验室研究角度尚难以接受。

本研究比较了超高速差速离心法和聚合沉淀法
分离胆汁外泌体的形态、粒径和标记物的差异,结果
显示,两种方法提出的外泌体的形态、粒径无明显差
异,超速离心法得到外泌体表明标记 CD63 和 CD81
阳性率较高,间接反映其提取纯度可能更高。而
RNA 水平、质量及 miRNA 的表达结果显示,超速离
心法提取出的 RNA 水平较低,同种方法行 RT-PCR
结果 CT 值较大。聚合沉淀法提取纯度低,但所得
RNA 量较多,或可成为疾病筛选的首选。另外,聚合
沉淀法并未完全采用试剂盒中方法,而是经过改良,
加入更多步骤的离心以去除胆汁中的杂质,程序亦较
为复杂。

本研究具有一定的局限性,首先,标本量及检测
的 RNA 种类有限,未对蛋白等进行检测;另外,本研
究对所用胆汁的量未进行分组,直接用 4 mL 胆汁进
行实验,在临床应用中 ERCP 术中获得的胆汁量参
差不齐,实验中若能从有限量的胆汁中分离出较多的
外泌体,将有利于研究的顺利开展。

参考文献

- [1] BECKER A, THAKUR B K, WEISS J M, et al. Extracel-
lular vesicles in cancer; cell-to-cell mediators of metastasis
[J]. Cancer Cell, 2016, 30(6): 836-848.
- [2] SEO N, AKIYOSHI K, SHIKU H. Exosome-mediated
regulation of tumor immunology[J]. Cancer Sci, 2018,
109(10): 2998-3004.
- [3] TAI Y L, CHEN K C, HSIEH J T, et al. Exosomes in
cancer development and clinical applications[J]. Cancer
Sci, 2018, 109(8): 2364-2374.
- [4] TAURO B J, GREENING D W, MATHIAS R A, et al.
Comparison of ultracentrifugation, density gradient sepa-
ration, and immunoaffinity capture methods for isolating
human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes
[J]. Methods, 2012, 56(2): 293-304.
- [5] LI L, MASICA D, ISHIDA M, et al. Human Bile Contains
MicroRNA-Laden extracellular vesicles that can be used
for cholangiocarcinoma diagnosis[J]. Hepatology, 2014,
60(3): 896-907.
- [6] RAIMONDO F, MOROSI L, CHINELLO C, et al. Ad-

- vances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery[J]. *Proteomics*, 2011, 11(4): 709-720.
- [7] ARBELAIZ A, AZKARGORTA M, KRAWCZYK M, et al. Serum extracellular vesicles contain protein biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma[J]. *Hepatology*, 2017, 66(4): 1125-1143.
- [8] GEZER U, OZGUR E, CETINKAYA M, et al. Long non-coding RNAs with low expression levels in cells are enriched in secreted exosomes[J]. *Cell Biol Int*, 2014, 38(9): 1076-1079.
- [9] MALIK Z A, KOTT K S, POE A J, et al. Cardiac myocyte exosomes: stability, HSP60, and proteomics[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 304(7): H954-H965.
- [10] DANG X, ZENG X. Targeted therapeutic delivery using engineered exosomes and its applications in cardiovascular diseases[J]. *Gene*, 2016, 575(2): 377-384.
- [11] SAMANDARI M, JULIA M G, RICE A, et al. Liquid biopsies for management of pancreatic cancer[J]. *Transl Res*, 2018, 201: 98-127.
- [12] LI X, WANG Y, WANG Q, et al. Exosomes in cancer: Small transporters with big functions[J]. *Cancer Lett*, 2018, 435: 55-65.
- [13] GE X, WANG Y, NIE J, et al. The diagnostic/prognostic potential and molecular functions of long non-coding RNAs in the exosomes derived from the bile of human cholangiocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41): 69995-70005.
- [14] SEVERINO V, DUMONCEAU J M, DELHAYE M, et al. Extracellular Vesicles in Bile as Markers of Malignant Biliary Stenoses[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(2): 495-504.
- [15] GREENING D W, XU R, JI H, et al. A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1295: 179-209.
- [16] MASYUK A I, HUANG B Q, WARD C J, et al. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(4): G990-G999.
- [17] LOBB R J, BECKER M, WEN S W, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma[J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 27031.

(收稿日期: 2019-03-22 修回日期: 2019-06-14)

(上接第 3404 页)

- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of performance for precision and trueness; approved guideline-second edition; EP15-A2[S]. Wayne, PA, USA; CLSI, 2005.
- [5] 王丹晨, 侯立安, 邱玲, 等. 4 种脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性测定试剂的性能评价[J]. *中华检验医学杂志*, 2018, 41(3): 208-213.
- [6] 兰庆站, 成士清, 刘义庆, 等. 贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪检测血浆脂蛋白磷脂酶 A2 的性能验证[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(18): 2249-2252.
- [7] Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) [J]. *JAMA*, 2001, 285: 2486-2497.
- [8] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of linearity of quantitative measurement procedures; A statistical approach; approved guideline; EP6-A [S]. Wayne, PA, USA; NCCLS, 2003.
- [9] National Committee for Clinical Laboratory Standards. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline-second edition; C28-A2[S]. Wayne, PA, USA; NCCLS, 2000.
- [10] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; approved guideline-second edition; EP9-A2 [S]. Wayne, PA, USA; NCCLS, 2002.
- [11] 中国老年学学会心脑血管病专业委员会, 中国医师协会检验医师分会心脑血管病专家委员会. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 临床应用专家建议[J]. *中华心血管杂志*, 2015, 43(10): 843-847.
- [12] ZHUO S Q, WOLFERT R L, YUAN C. Biochemical differences in the mass and activity tests of lipoprotein associated phospholipase A2 explain the discordance in results between the two assay methods[J]. *Clin Chem*, 2017, 50(18): 1209-1215.
- [13] OLIVER L K, VOSKOBOEV N, HESER D, et al. Assessment of clinical performance without adequate analytical validation: A prescription for confusion [J]. *Clin Chem*, 2011, 44(14/15): 1247-1252.

(收稿日期: 2019-03-28 修回日期: 2019-06-20)